セルファイン ET クリーンは、多孔性球状セルロース粒子に化学的に安定なエポキシ活性化法でεポリリジンを固定化した、エンドトキシン高選択吸着剤です。ET クリーンはバッファーやタンパク質溶液からエンドトキシンを高選択的に除去することが可能です。

材料

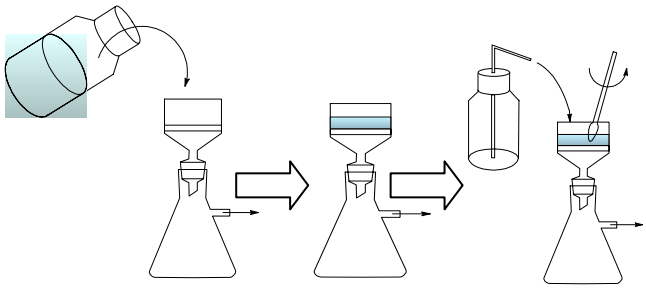
セルロファイン ET クリーン/*中低圧カラム/ポンプ吸引ピン

ガラスフィルターor ブフナーロート/純水/PF 水

＊ 中低圧カラムは、各社販売のカラムが使用できます.

＊ PF 水(パイロジェンフリー水)は注射用蒸留水やそれと同等な膜ろ過水を推奨します。

（ゲルスラリーの調整）



・ 使用する材料を室温にする。

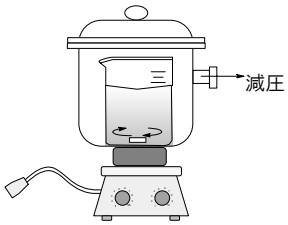
・ 製品のボトルを数回振り、スラリーを均一にする。

・ 吸引ろ過により保存剤（20%EtOH）を吸引除去する。

・ 純水で EtOH 臭が無くなるまでろ過洗浄する。

・ ビーカーに、脱水ゲルと純水を加え、良く撹枠した後、吸引ろ過をする（２～３回）。（純水は脱水ゲル容量のおおよそ 1～1.5 倍使用する）

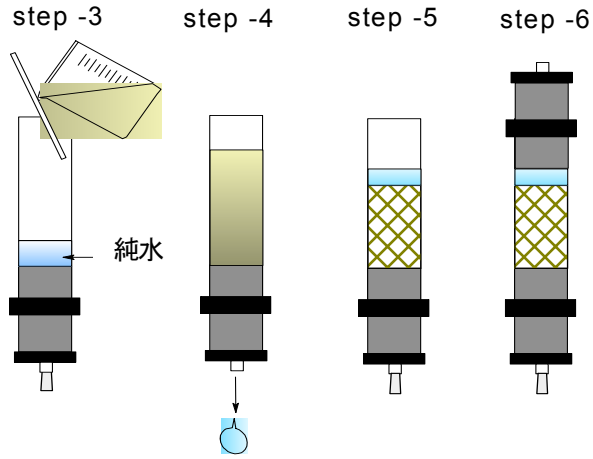
・ ビーカーに、脱水ゲルと純水を加えおおよそ 40～50%のスラリーを調製し、減圧下で 30 分～40 分鋭気する。

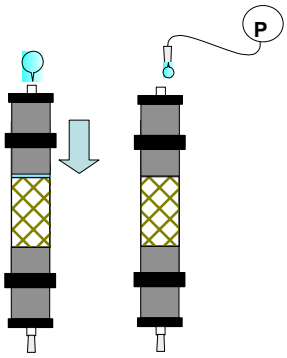



※脱気する際にマグネチックスターラーで緩やかに撹拌するとより効果的に脱気できます。

（カラムの充填）

1. カラムの組立て、操作方法はカラムの取扱説明書を参照ください。カラムは事前に 1mol/L NaOH などに浸漬してエンドトキシンを除去しておく。カラムのエンドトキシン除去についてもカラムの取扱説明書を参照下さい。
2. カラムの下部に栓をして少量の純水を加えておく。（カラムのゲルサポートは脱気しておく）
3. 脱気したゲルスラリーを良くかき混ぜて均一にして、カラム内へ注ぎ込む
4. カラム下部より純水を流出させて、ゲルベットを形成させる。
5. 目的の高さよりやや高い（1～2cm）位置までゲルベットを形成させ、更にその上部 1～2cm 上まで純水を加えて、カラム下部にプラグをする。
6. カラム上部のゲルサポートをセットする。




・ カラム下部のプラグをする

・ 上部サポーターを徐々に下ろす。（カラム上部出口より液がでてくる）

・ 液の満たされたラインをカラム上部に接続する。

（カラムの平衡化とエンドトキシンフリー化）

1. 充填したカラムをポンプにつなぎ、純水を流してゲルベットを安定化させます。送液圧力はおよそ 1～2MPa 以下で行います。
2. カラムベッドが安定したら（高さが安定したら）カラム高さを調整する。多い場合は駒込ピペットで取り除き、少ない場合はゲルを加える。
3. 希望のカラム高さになったら、ベッドサポートをゲルベッド上面に密着させる。

4. 0.2mol/L NaOH[1] をカラム体積の２倍流した後に送液をやめ、16 時間以上放置する。その後、再びカラムの２倍量のアルカリを流す。
5. PF 水をゲルベッド体積の５倍程度流す。
   ※ カラム溶出液が中性になれば、溶出液中のエンドトキシンを LAL 法等で測定しエンドトキシンの除去を確認する。
   ※ LAL 測定キットは生化学工業（エンドスペシー）や和光純薬工業（リムルス ES Ⅱ）で販売している。
6. 使用する吸着バッファーを流しカラムを平衡化する。吸着バッファーはエンドトキシン濃度が低い事が望ましい。

※セルファイン ET クリーンを使用すると低エンドトキシンバッファーを簡単に調製することができる。（添付資料参照）

（サンプルの調製）

添加するサンプルのイオン強度は、吸着バッファーと同じかそれ以下になるように調整します。 吸着バッファーに対してサンプルを透析するか、より簡単にするためには、**セルファイン GH-25** によるバッファー交換ゲルろ過によってサンプルを調整することができます。サンプルの中の不溶物は、カラムへ添加する前に、メンブランフィルターで除去しておきます。

（流速）

エンドトキシンは一般的に低い流速の方がより吸着除去できる傾向があります。

（吸着）

セルファイン ET クリーンへのエンドトキシン吸着は、通常 中性の pH の 10～50mM のバッファーを使用することができます。この場合、酸性のタンパク質はカラムに吸着する可能性が高いですが、NaCl のグラジェントにより回収することが出来ます。

※ ET クリーンでエンドトキシンを除去する最適条件は添付“ET クリーン エンドトキシン除去実験法（バッチ法）”で設定することができます。
※ ET クリーンは陰イオン交換的な性質も持っていますので、通常塩基性のタンパク質は吸着しません。一方、酸性のタンパク質は吸着する傾向があります。
※ 目的サンプルの等電点付近では ET クリーンに吸着し難い傾向があります。

（溶出）

セルファイン ET クリーンからの目的サンプルの溶出には、NaCl の直線的なグラジェントが一般的に採用されている。グラジェントはカラム体積の５倍から１０倍の容積で、吸着バッファーに含まれる NaCl 濃度を最終的に 0.5mol/L 程度まで増加させる。目的サンプルが溶出されない場合には、更に高濃度の NaCl を流すか、バッファーの pH を変えてみる。

NaCl の直線的グラジェントの他にも、NaCl 濃度のステップワイズ溶出や pH グラジェント、pH ステップワイズによる溶出も可能。

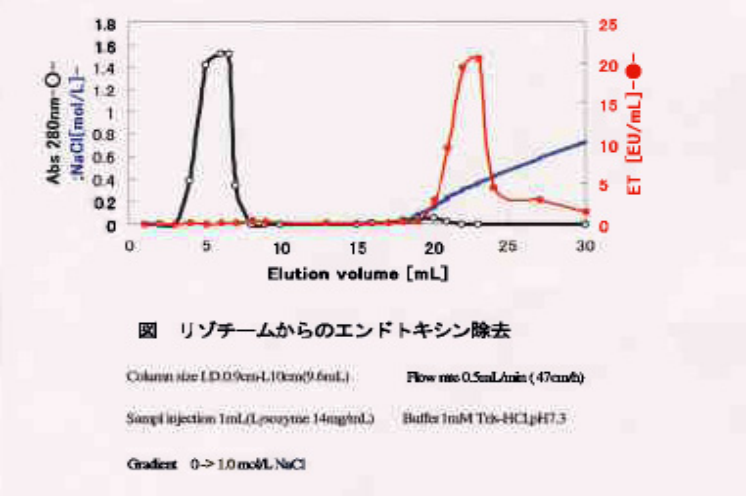



図 リゾチームからのエンドトキシン除去

Column size I.D.0.9cm-L.10cm(9.6mL) Flow rate 0.5mL/min (47cm/h)

Sample injection 1mL(Lysozyme 14mg/mL) Buffer 1mM Tris-HCl,pH7.3

Gradient 0-> 1.0 mol/L NaCl

連続的なサンプル注入

ET クリーンによるエンドトキシン除去を最適化すれば、小さなカラムで大量のサンプルからのエンドトキシン除去が可能です。

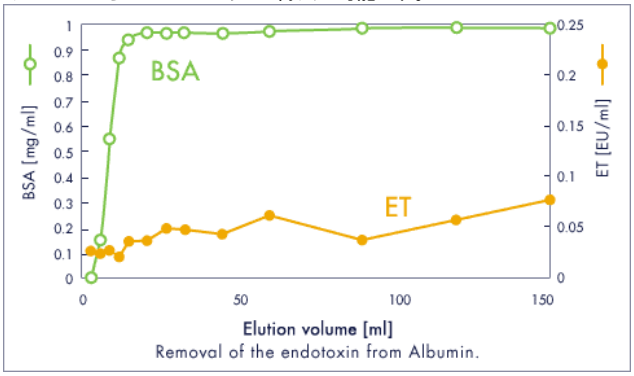



図 BSA からのエンドトキシンの連続除去

Column size LD.1.1cm-L.1cm(1mL) Flow rate 0.17mL/min.(10cm/h)

Sample injection 150mL (BSA 1mg/mL ET 100EU/mL)

Buffer 50mM PB, pH7+0.15mol NaCl

[1] 0.2M NaOH に 20%以上のエタノールを加えるとより効果的なエンドトキシンフリー操作が可能です。

（再生）

高イオン強度のバッファー（1-2mol/L NaCl 含有バッファー）を用いて溶出液の UV をモニターし、十分に値が低く、変化がなくなるまで洗浄する。0.2mol/L NaOH[2]をカラム体積の２倍流した後に送液をやめ、１６時間以上放置する。その後再びカラムの 2 倍量のアルカリを流す。その後、再び吸着バッファーで平衡化する。

(保存)

開封後のセルファイン ET クリーンを保存する場合は、良く洗浄した後に、20%エタノールに液を置換して、２～８℃で保存することを推奨いたします。

（オーダーインフォメーション）

| 製品番号 | 品名 | 包装 |
|---|---|---|
| 20051 | ミニカラム<br>セルファイン ＥＴクリーンＬ | 1ml x 5 |
| 20015 | ミニカラム<br>セルファイン ＥＴクリーンＬ | 5ml x 1 |
| 681 984 324 | セルファイン ＥＴクリーンＬ | 10mL |
| 681 984 326 | セルファイン ＥＴクリーンＬ | 50mL |
| 681 984 328 | セルファイン ＥＴクリーンＬ | 500mL |
| 20151 | ミニカラム<br>セルファイン ＥＴクリーンＳ | 1ml x 5 |
| 20115 | ミニカラム<br>セルファイン ＥＴクリーンＳ | 5ml x 1 |
| 682 985 324 | セルファイン ＥＴクリーンＳ | 10mL |
| 682 985 326 | セルファイン ＥＴクリーンＳ | 50mL |
| 682 985 328 | セルファイン ＥＴクリーンＳ | 500mL |

JNC株式会社

化学品事業部ライフケミカル部
〒100-8105 東京都大手町二丁目２番１号
電話 03-3243-6150 FAX 03-3243-6219
E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp
URL: http://www.jnc-corp.co.jp/fine/en/cellufine

[2] 0.2M NaOH に 20%以上（～95%）のエタノールを加えるとより効果的なエンドトキシンフリー操作が可能です。

＜添付資料：ETクリーンによるエンドトキシンフリーバッファーの調製＞

# ET clean L can easy to remove LPS from buffers.

ET clean L easily reduces LPS to low concentrations compared with polymyxin-immobilized agarose gel or DEAE Cellufine A-500(anion-exchanger).

Materials & Method

Column : 9mm I.D. x 100mm

Pump : Peristaltic with silicon tube

Buffer : 1M sodium phosphate, pH 7.0 (spiked 2.6 EU/ml LPS)

LPS Removal (pre-washing)

Column & media: wash with 5CV 0.2 M NaOH; let stand for 16 hours, then wash with endotoxin-free water.

Silicon tubing: wash with 0.5 M NaOH, let stand for 16 hours, then wash with endotoxin-free water.

※0.2 M NaOH-20% EtOH is more effective for endotoxin-free.

ChromatographyFlow rate : 30ml/h [Residence time 12.8min; linear velocity 47cm/h]

Fraction 6.36ml (total 128 tubes)

Assay

LAL (rate assay, EndospecyES-50M Set; SEIKAGAKU CORPORATION)

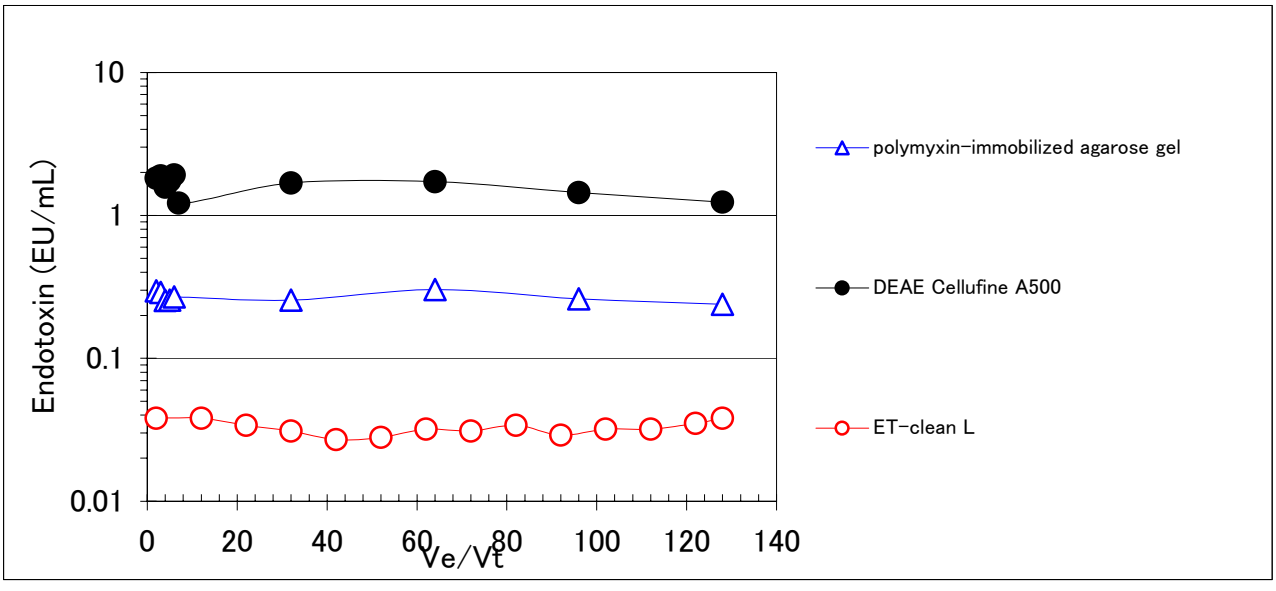



**Fig. Comparison of the LPS removal capability from 1M phosphate buffer of ET-clean L, and polymyxin-immobilized agarose gel and DEAE Cellufine A500.**

## ＜添付資料：ET クリーン　エンドトキシン除去実験法（バッチ法）＞

【目的】

セルロファイン™シリーズのエンドトキシン除去ゲル「ET クリーン」を用いたエンドトキシン除去実験（バッチ法）についての一般的な操作方法を紹介する。

【材料と方法】

器具

ガラスろ過器：（例えば柴田科学機器製　P40,P100）容量は処理するゲル量によって選択する。

薬さじ（スパーテル）：金属製

駒込ピペットあるいはパスツールピペット：ガラス製

浸漬用の容器：ビーカーあるいはねじロビン（デュラン、PYREX など）赤キャップ（メラミン樹脂）

保存用容器：ねじロビン（デュラン、PYREX など）赤キャップ（メラミン樹脂）、あるいはパイロジェンフリー保証のスピッツ管（例えば旭テクノグラス製　遠沈管）

アルミ箔：家庭用のもので可

三角フラスコ：10mL～20mL　栓付きあるいは栓無し

シリンジ：注射用ディスポーザブルシリンジ 1～2.5mL

メンブランフィルター：25CS080AS, γ線照射済（アドバンテック製）

エンドトキシン濃度測定：生化学工業あるいは和光純薬工業の測定キットと測定に必要な基材（測定装置、ピペットチップ、試薬）

水：実験用の超純水製造装置で作られたものを使用する場合は、事前に水のエンドトキシンが十分に低いか調べておく必要がある。注射用蒸留水であればエンドトキシンの心配はない。

操作

１．器具のエンドトキシンフリー化操作[3]

ガラス器具類は清浄に洗浄した後、乾燥させる。開口部をアルミ箔で被い 250℃/3 時間の乾熱滅菌を行う。

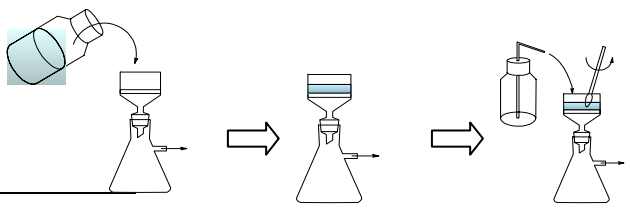
金属類（スパーテルなど）は清浄に洗浄した後、乾燥させアルミ箔で被い 250℃/3 時間の乾熱滅菌を行う。

ねじロビンのガラス部分は、ガラス器具と同じ方法で乾熱滅菌する。樹脂部分はアルミ箔で被い 180℃３時間の乾熱滅菌を行う（注意：樹脂部分の乾熱滅菌は、ねじロビンのメーカーの注意事項に従ってください）

アルミ箔は、適当な大きさ（5cm 角程度）に切りそろえて、ガラス製あるいは金属製シャーレなどの容器に入れて 250℃/3 時間の乾熱滅菌を行う。

２．ゲルのエンドトキシンフリー化操作

ET クリーンは 20%エタノールが保存液として入っている。まずボトルを撹拌してゲルをスラリー化する。ガラスフィルターに適量を入れ吸引ろ過する。純水でエタノール臭が無くなるまで、吸引ろ過する。



[3] 乾熱滅菌した器具は温度が十分低くなってから取り出すようにしてください。

0.2mol/L NaOH／20%ＥｔＯＨ[4)]を実験用超純水で調製する。

水洗したガラスフィルター上のゲルに、0.2mol/L NaOH／20%ＥｔＯＨをゲルが完全に浸るまで加える。薬さじで軽く攪拌し、吸引ろ過する。このアルカリ洗浄を３回行う。

３回アルカリ洗浄したゲルは吸引ろ過によってアルカリ水溶液を除去する。（吸引ろ過時間は、フィルター出口から液がほとんどでなくなる程度が適当。）ゲルケーキを浸漬用のビーカーあるいはネジロビンへ入れ、ゲル体積のおよそ２倍量の 0.2mol/L NaOH／20%ＥｔＯＨを加え、4℃～25℃で一晩（およそ 16 時間程度）放置する。

アルカリ中に放置したゲルは、乾熱滅菌したガラスフィルターで再び、0.2mol/L NaOH20%ＥｔＯＨでろ過洗浄（３回）をおこなった後に、パイロジェンフリー水（エンドトキシンが低濃度であることが確認された実験用超純水あるいは注射用蒸留水）で中性になるまでろ過洗浄する。この段階の洗浄場所はクリーンブース、クリーンベンチなど落下菌の無い環境が望ましい。中性の確認は pH 試験紙や pH メータで行い、pH8 以下を目標にする。次に使用する緩衝液（実験の計画した最低塩濃度）でフィルター出口の pH がその緩衝液と同じになるまにろ過洗浄を行い、平衡化をする。ガラスフィルターの上部を滅菌アルミ箔で被う。平衡化後のろ過液、あるいはパイロジェンフリー水でのろ過液のエンドトキシンを測定しエンドトキシンフリーを確認する。最後のろ過時間はおよそ 10 分～15 分吸引を続けて、液を切る。この状態のゲルで湿重量を量りその時の重さを g-wet で表す。またこの状態のゲルをサクションドライゲルを呼ぶ。

エンドトキシンフリーのゲルはすぐに秤量しバッチ実験に用いるか、乾熱滅菌した容器に移し密閉保存する。長期保存の場合は、パイロジェンフリー水、あるいは注射用生理食塩水を加えて密閉保存（４℃程度）する。

３．バッチ吸着実験

３－１　塩濃度

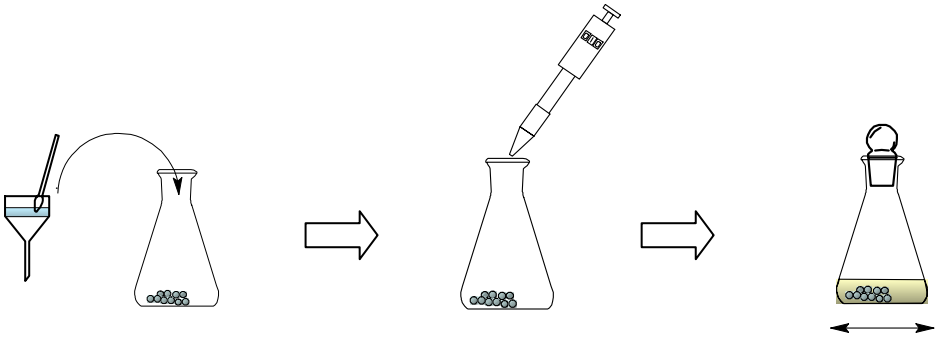
塩濃度（イオン強度）を変えて、タンパク質の吸着量とエンドトキシンの吸着量を測定して、最適な塩濃度を設定する。

表１　サンプル系列の例（サンプル希釈率 75%）

| 最終塩濃度 mol/L | サンプル mL | 4M NaCl mL | PF水 mL |
|---|---|---|---|
| 0.00 | 1.5 | 0.000 | 0.50 |
| 0.05 | 1.5 | 0.025 | 0.48 |
| 0.10 | 1.5 | 0.050 | 0.45 |
| 0.20 | 1.5 | 0.100 | 0.40 |
| 0.30 | 1.5 | 0.150 | 0.35 |
| 0.40 | 1.5 | 0.200 | 0.30 |
| 0.50 | 1.5 | 0.250 | 0.25 |
| 0.60 | 1.5 | 0.300 | 0.20 |
| 0.70 | 1.5 | 0.350 | 0.15 |
| 0.80 | 1.5 | 0.400 | 0.10 |
| 0.90 | 1.5 | 0.450 | 0.05 |
| 1.00 | 1.5 | 0.500 | 0.00 |

[4] NaOH 水溶液は目に入ると失明の恐れが有るので、保護めがね（ゴーグルタイプを推奨）を着用して操作ください。

①サンプルの秤量 ②サンプルの添加 ③攪拌



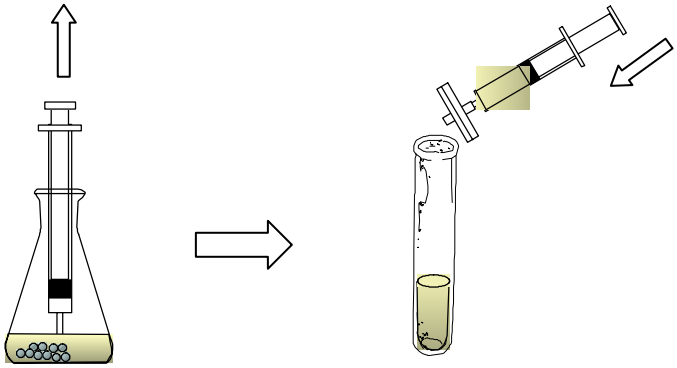
① エンドトキシンフリーにしたゲルを、10～20mL の三角フラスコに 0.2g を量り入れる。

② 表１で調製したサンプルを秤量したゲルに 2mL 加える。

③ 栓あるいは、滅菌アルミ箔で口を被い、攪拌を行う。攪拌時間は通常２時間で温度は 25℃で行うが、サンプルが熱に不安定の場合は低温で行う。

④ 注射用シリンジを使って液を吸い上げる。吸い上げた液は、シリンジにメンブランフィルター（25CS080AS, γ線照射済（アドバンテック製））でろ過する。

⑤ ろ過液は先ずエンドトキシンの定量を行い、残液でタンパク質の定量を行う。



④吸上 ⑤ろ過

注意

① ブランクテストは、吸着剤ゲルの変わりにパイロジェンフリー水を 0.2mL 加えて、それ以外は同様に操作する。

② 表１の最終イオン強度は緩衝液のイオン強度を考慮していない。事前にサンプル緩衝液濃度を 0.01～0.05mol/L 程度に調製しておく。

③ 4mol/L NaCl を 100mL 作る場合は 23.4g の NaCl を量りパイロジェンフリー水で 100mL にする。よりエンドトキシン濃度が低い液を調製する場合は、23.4g の NaCl を 100mL メスフラスコに量り入れて、250℃、3 時間乾熱滅菌してからパイロジェンフリー水で 100mL に溶かす。

④ 攪拌する三角フラスコを、前述のパイロジェンフリーの保証された遠沈管で行っても良い。

⑤ 攪拌を効率的にするには、旋回型の攪拌やロータリー型の攪拌が有効である。また、テフロン被覆された回転子は 250℃、3 時間乾熱滅菌できるので、マグネチックスターラーで攪拌することも可能である。

⑥ タンパク質の定量は紫外部 280nm の吸光度から求めるほか、各種比色定量法で求める。また活性等を測定するために、試験液が 2mL で不足する場合は表 1 の液量を適宜比例倍して実験する。その際、吸着ゲル量も同様に増やす。

⑦ 試験液量と吸着ゲル量の比率は、この実験では 10 倍に設定しているが、汚染したエンドトキシン濃度によって適宜変更してよい。

⑧ イオン濃度以外に pH の影響を調査する実験では、パイロジェンフリー水で洗浄した吸着剤ゲルを使用する。事前にサンプルはバッファー交換しておくことが必要。